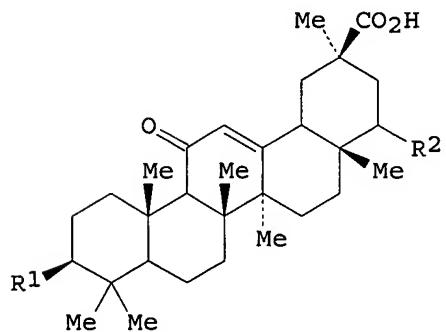


on STN

1992:152093 Document No. 116:152093 Glycyrrhetic acid metabolites
as 3 α - hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors.

Hattori, Yukio; Akao, Mitsuaki; Aoyama, Muneo; Akao, Yasuko; Hatsutori,
Yukio; Nanba, Tsuneo (Tsumura and Co., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP
03275698 A 19911206 Heisei, 6 pp. (Japanese). CODEN: JKXXAF.
APPLICATION: JP 1990-72120 19900323.

GI



I

AB The title compds. (I; R1 = OH, O; R2 = H, OH), useful as 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors and antiinflammatory agents, are prepared and formulated. Jones oxidation of glycyrrhetic acid in Me₂CO gave 3-oxoglycyrrhetic acid I (R1 = O, R2 = H), which was incubated with rat liver microsome and NADPH in K phosphate buffer at pH 7.2 to give I (R1 = O, R2 = α -OH) (II). II showed 60% inhibition of reduction of 3-oxo-5 β -androstan-17 β -ol. Three tablet formulations and a granular formulation were given.

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-72120

⑬ Int. Cl.⁵
A 61 K 35/78
// C 07 G 17/00識別記号 ADU C 8413-4C
Z 8318-4H

⑭ 公開 平成2年(1990)3月12日

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全20頁)

⑮ 発明の名称 制癌剤

⑯ 特願 平1-125070
⑰ 出願 平1(1989)5月18日

優先権主張 ⑱ 昭63(1988)6月15日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭63-147676

㉑ 発明者	松尾 俊治	神奈川県相模原市松ヶ枝町5-16
㉒ 発明者	東海林 敏勝	神奈川県綾瀬市夢川2-12-67 タウニー夢川103
㉓ 発明者	岩本 昌也	神奈川県相模原市松ヶ枝町5-13
㉔ 発明者	内野 敬二郎	神奈川県厚木市戸室1241-11
㉕ 出願人	日本製粉株式会社	東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目27番5号
㉖ 代理人	弁理士 中村 稔	外2名

明細書

1522、1443、1374、

1. 発明の名称 制癌剤 1283、1224、1157、

2. 特許請求の範囲 1110、1063、818、

(i) 次の理化学的性質を有するNPF-888U-I、 765。

NPF-888U-II、NPF-888U-IIA、NPF-888U-IB、 (vi) 紫外線吸収スペクトル

NPF-888U-IIA及びNPF-888U-IIBからなる群 λ_{max} nm ($E^{\frac{1}{\%}}_{1\text{cm}}$) 279 (127.5)
より選ばれる物質を有効成分とする制癌剤。NPF-888U-I λ_{max} nm ($E^{\frac{1}{\%}}_{1\text{cm}}$) 279 (124.7)

(i) 形状：淡褐色粉末

(ii) 融点：明瞭な融点、分解点を示さない。

(iii) 元素分析：

C : 54.56%

(vii) 溶解性：

H : 4.31%

水、メタノール、エタノールに可溶、ヘキ

N : 0.44%

サン、エーテル、酢酸エチル、クロロホルム

灰分： 1.28%

不溶。

O : 34.14%

(viii) 星色反応：

(iv) 分子量：1.000~10.000

塩化第2鉄 (+)

(透析チューブによる)

ニンヒドリン (-)

(v) 赤外線吸収スペクトル

p-アニシジン-フタル酸 (-)

 $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3410、2924、1611、

アニシジン-ジフェニルアミン (-)

ドーラーゲンドルフ
NPF-88BU-II

(i) 形 状：淡褐色粉末
(ii) 融 点：明瞭な融点、分解点を示さない。

(iii) 元素分析：

C : 55.18%

H : 4.46%

N : 0.39%

灰分 : 0.97%

O : 35.17%

(iv) 分子量 : 10,000以上

(透析チューブによる。)

(v) 赤外線吸収スペクトル

 $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3394、2924、1608、
1520、1442、1366、
1286、1247、1158、
1108、1063、820、
767。

(vi) 紫外線吸収スペクトル

C : 49.63%

H : 4.71%

N : 0.06%

灰分 : 4.46%

O : 35.09%

(iv) 分子量 : 7,850

(ポリエチレングリコールを標準とした
ゲル浸透クロマトグラフィーによる。)

(v) 赤外線吸収スペクトル

 $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3410、2924、2852、
1608、1521、1442、
1383、1285、1248、
1206、1159、1111、
1065、802、

(vi) 紫外線吸収スペクトル

水 $\lambda_{\text{max}} \text{ nm} \left(E \frac{1\%}{1\text{cm}} \right) 280 (76.2)$

0.1規定塩酸 $\lambda_{\text{max}} \text{ nm} \left(E \frac{1\%}{1\text{cm}} \right) 278 (65.0)$

水 $\lambda_{\text{max}} \text{ nm} \left(E \frac{1\%}{1\text{cm}} \right) 279 (120.9)$

0.1規定塩酸 $\lambda_{\text{max}} \text{ nm} \left(E \frac{1\%}{1\text{cm}} \right) 279 (122.4)$

0.1規定水酸化ナトリウム $\lambda_{\text{max}} \text{ nm} \left(E \frac{1\%}{1\text{cm}} \right)$ なし

(vii) 溶解性 :

水、メタノール、エタノールに可溶。ヘキサン、エーテル、酢酸エチル、クロロホルム不溶。

(viii) 呈色反応 :

塩化第2鉄 (+)

ニンヒドリン (-)

p-アニシジン-フタル酸 (-)

アニシジン-ジフェニルアミン (-)

ドーラーゲンドルフ (-)

NPF-88BU-IA

(i) 形 状：淡褐色粉末

(ii) 融 点：明瞭な融点、分解点を示さない。

(iii) 元素分析 :

0.1規定水酸化ナトリウム $\lambda_{\text{max}} \text{ nm} \left(E \frac{1\%}{1\text{cm}} \right)$ なし

(vii) 溶解性 :

水、メタノール、エタノールに可溶。ヘキサン、エーテル、酢酸エチル、クロロホルム不溶。

(viii) 呈色反応 :

塩化第2鉄 (+)

ニンヒドリン (-)

アニシジン-ジフェニルアミン (-)

ドーラーゲンドルフ (-)

p-アニシジン-フタル酸 (-)

NPF-88BU-IB

(i) 形 状：淡褐色粉末

(ii) 融 点：明瞭な融点、分解点を示さない。

(iii) 元素分析 :

C : 55.66%

H : 4.63%

N : 0.26%

灰分 : 2.43%

O : 39.75%

(iv) 分子量: 5,950

(ポリエチレングリコールを標準とした
ゲル浸透クロマトグラフィーによる)。

(v) 赤外線吸収スペクトル

$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3404、2930、1608、
1519、1443、1371、
1282、1248、1212、
1157、1111、1063、
820、

(vi) 紫外線吸収スペクトル

水 λ_{max} nm ($E \frac{1\%}{1\text{cm}}$) 278 (51.4)
0.1 規定塩酸 λ_{max} nm ($E \frac{1\%}{1\text{cm}}$) 279 (72.9)
0.1 規定水酸化ナトリウム λ_{max} nm ($E \frac{1\%}{1\text{cm}}$) なし

(vii) 溶解性:

水、メタノール、エタノールに可溶。ヘキサン、エーテル、酢酸エチル、クロロホルム

$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3398、2924、1607、
1520、1442、1375、
1283、1256、1111、
1064、799、

(vi) 紫外線吸収スペクトル

水 λ_{max} nm ($E \frac{1\%}{1\text{cm}}$) 279 (74.7)
0.1 規定塩酸 λ_{max} nm ($E \frac{1\%}{1\text{cm}}$) 279 (78.3)
0.1 規定水酸化ナトリウム λ_{max} nm ($E \frac{1\%}{1\text{cm}}$) なし

(vii) 溶解性:

水、メタノール、エタノールに可溶。ヘキサン、エーテル、酢酸エチル、クロロホルム
不溶。

(viii) 呈色反応:

塩化第2鉄	(+)
ニンヒドリン	(-)
アニシジン-ジフェニルアミン	(-)
ドラーゲンドルフ	(-)

不溶。

(ix) 呈色反応:

塩化第2鉄	(+)
ニンヒドリン	(-)
アニシジン-ジフェニルアミン	(-)
ドラーゲンドルフ	(-)
p-アニシジン-フタル酸	(-)

NPF-88BU-II A

(i) 形状: 淡褐色粉末
(ii) 融点: 明瞭な融点、分解点を示さない。
(iii) 元素分析:

C : 52.75%
H : 4.73%
N : 0.33%
灰分: 1.84%
O : 34.46%

(iv) 分子量: 11,900

(ポリエチレングリコールを標準とした
ゲル浸透クロマトグラフィーによる)。

(v) 赤外線吸収スペクトル

p-アニシジン-フタル酸 (-)

NPF-88BU-II B

(i) 形状: 淡褐色粉末
(ii) 融点: 明瞭な融点、分解点を示さない。
(iii) 元素分析:

C : 54.24%
H : 4.50%
N : 0.21%
灰分: 1.81%

(iv) 分子量: 11,300

(ポリエチレングリコールを標準とした
ゲル浸透クロマトグラフィーによる)。

(v) 赤外線吸収スペクトル

$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3376、2926、1607、
1519、1442、1366、
1283、1251、1209、
1109、1062、820、

(vi) 紫外線吸収スペクトル

水	$\lambda_{\text{nm}} \left(E \frac{1\%}{1\text{cm}} \right) 280 (98.8)$
0.1規定塩酸	$\lambda_{\text{nm}} \left(E \frac{1\%}{1\text{cm}} \right) 280 (100.4)$
0.1規定水酸化ナトリウム	$\lambda_{\text{nm}} \left(E \frac{1\%}{1\text{cm}} \right)$ なし

(vii) 溶解性：

水、メタノール、エタノールに可溶。ヘキサン、エーテル、酢酸エチル、クロロホルム不溶。

(viii) 呈色反応：

塩化第2鉄	(+)
ニンヒドリン	(-)
アニシジンージフェニルアミン	(-)
ドラーゲンドルフ	(-)
p-アニシジン-フタル酸	(-)

(2) 脱脂したブドウの皮のメタノール抽出物を、透析チューブにより分画して得られる分子量
1,000~10,000の画分からなるブドウの皮の親水性溶媒抽出物を有効成分とする制癌剤。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は制癌剤に関する。

〔発明の背景〕

従来、癌化学療法剤として、アルキル化剤（ナイトロゼンマスターD類、エチレンイミン類、スルフォン酸エステル類、ニトロソウレア類）、代謝拮抗物質（メトトレキセート、フルオラフル、シトシンアラビノサイド、シクロシチジン等）、植物性抗癌剤（コルセミド、ビンプラスチン、ポルフィリリン等）、抗生物質（ブレオマイシン、アドリアマイシン、マイトマイシン等）、ホルモン類（副腎ステロイド、男性ホルモン、女性ホルモン）、免疫賦活剤（クレスチン、ビシバニール等）及びポルフィリリン錯塩（マーフィリン、COPP等）が用いられている。しかし一般に制癌物質の作用は癌細胞だけでなく正常細胞にも作用するために毒性が強く、重大な副作用を呈するので、感染症に対する化学療法剤の如く大量の薬剤を使用することによって十分な効果を上げることは困難な

現状にある。

〔発明の目的〕

従来の制癌剤は、前述のように毒性が強く、副作用を有するもののが多かった。そこで本発明は、従来の制癌剤より毒性が低く、大量投与の可能な制癌剤を提供することを目的とするものである。

〔発明の構成〕

本発明は下記の理化学的性質を有するNPF-88BU-I、NPF-88BU-II、NPF-88BU-IA、NPF-88BU-IB、NPF-88BU-IIA及びNPF-88BU-IIBからなる群より選ばれる少くとも1種を有効成分とする制癌剤を提供するものである。

NPF-88BU-I

(i) 形 状：淡褐色粉末

(ii) 融 点：明瞭な融点、分解点を示さない。

(iii) 元素分析：

C : 54.56%

H : 4.31%

N : 0.44%

灰分 : 1.28%

O : 34.14%

(iv) 分子量: 1,000~10,000

(透析チューブによる)

(v) 赤外線吸収スペクトル (第1図に示す)

$\nu_{\text{max}}^{\text{IR}} \text{ cm}^{-1}$: 3410、2924、1611、
1522、1443、1374、
1283、1224、1157、
1110、1063、818、
765。

(vi) 紫外線吸収スペクトル (第2~4図に示す)

水 $\lambda_{\text{max}}^{\text{nm}} (E \frac{1\%}{1\text{cm}}) 279 (127.5)$

0.1規定塩酸 $\lambda_{\text{max}}^{\text{nm}} (E \frac{1\%}{1\text{cm}}) 279 (124.7)$

0.1規定水酸化ナトリウム $\lambda_{\text{max}}^{\text{nm}} (E \frac{1\%}{1\text{cm}}) なし$

(vii) 溶解性:

水、メタノール、エタノールに可溶、ヘキサン、エーテル、酢酸エチル、クロロホルムに不溶。

1286、1247、1158、
1108、1063、820、
767。

(vi) 紫外線吸収スペクトル (第6~8図に示す)

水 $\lambda_{\text{max}}^{\text{nm}} (E \frac{1\%}{1\text{cm}}) 279 (120.9)$

0.1規定塩酸 $\lambda_{\text{max}}^{\text{nm}} (E \frac{1\%}{1\text{cm}}) 279 (122.4)$

0.1規定水酸化ナトリウム $\lambda_{\text{max}}^{\text{nm}} (E \frac{1\%}{1\text{cm}}) なし$

(vii) 溶解性:

水、メタノール、エタノールに可溶。ヘキサン、エーテル、酢酸エチル、クロロホルムに不溶。

(viii) 呈色反応:

塩化第2鉄 (+)

ニンヒドリン (-)

p-アニシジン-フタル酸 (-)

アニシジン-フェニルアミン (-)

ドラーゲンドルフ (-)

(ix) 呈色反応:

塩化第2鉄 (+)

ニンヒドリン (-)

p-アニシジン-フタル酸 (-)

アニシジン-フェニルアミン (-)

ドラーゲンドルフ (-)

NPF-88BU-II

(i) 形状: 淡褐色粉末

(ii) 融点: 明瞭な融点、分解点を示さない。

(iii) 元素分析:

C : 55.18%

H : 4.46%

N : 0.39%

灰分 : 0.97%

O : 35.17%

(iv) 分子量: 10,000以上

(透析チューブによる。)

(v) 赤外線吸収スペクトル (第5図に示す)

$\nu_{\text{max}}^{\text{IR}} \text{ cm}^{-1}$: 3394、2924、1608、
1520、1442、1366、

NPF-88BU-II A

(i) 形状: 淡褐色粉末

(ii) 融点: 明瞭な融点、分解点を示さない。

(iii) 元素分析:

C : 49.63%

H : 4.71%

N : 0.06%

灰分 : 4.46%

O : 35.09%

(iv) 分子量: 7,850

(ポリエチレングリコールを標準とした
ゲル浸透クロマトグラフィーによる。)

(v) 赤外線吸収スペクトル

$\nu_{\text{max}}^{\text{IR}} \text{ cm}^{-1}$: 3410、2924、2852、
1608、1521、1442、
1383、1285、1248、
1206、1159、1111、
1065、802、

(vi) 紫外線吸収スペクトル

水 λ_{max} nm (E 1% / 1 cm) 280 (76.2)

0.1規定塩酸 λ_{max} nm (E 1% / 1 cm) 278 (65.0)

0.1規定水酸化ナトリウム λ_{max} nm (E 1% / 1 cm) なし

(vii) 溶解性：

水、メタノール、エタノールに可溶。ヘキサン、エーテル、酢酸エチル、クロロホルム不溶。

(viii) 呈色反応：

塩化第2鉄	(+)
ニンヒドリン	(-)
アニシジンージフェニルアミン	(-)
ドラーゲンドルフ	(-)
p-アニシジン-フタル酸	(-)

NPF-888U-I B

(i) 形状：淡褐色粉末

(ii) 融点：明瞭な融点、分解点を示さない。

(iii) 元素分析：

0.1規定水酸化ナトリウム λ_{max} nm (E 1% / 1 cm) なし

(vii) 溶解性：

水、メタノール、エタノールに可溶。ヘキサン、エーテル、酢酸エチル、クロロホルム不溶。

(viii) 呈色反応：

塩化第2鉄	(+)
ニンヒドリン	(-)
アニシジンージフェニルアミン	(-)
ドラーゲンドルフ	(-)
p-アニシジン-フタル酸	(-)

NPF-888U-II A

(i) 形状：淡褐色粉末

(ii) 融点：明瞭な融点、分解点を示さない。

(iii) 元素分析：

C : 52.75%

H : 4.73%

N : 0.33%

灰分 : 1.84%

C : 55.66%

H : 4.63%

N : 0.26%

灰分 : 2.43%

O : 39.75%

(iv) 分子量 : 5,950

(ポリエチレングリコールを標準とした
ゲル浸透クロマトグラフィーによる)。

(v) 赤外線吸収スペクトル

ν_{max} cm⁻¹ ; 3404, 2930, 1608,
1519, 1443, 1371,
1282, 1248, 1212,
1157, 1111, 1063,
820,

(vi) 紫外線吸収スペクトル

水 λ_{max} nm (E 1% / 1 cm) 278 (51.4)
0.1規定塩酸 λ_{max} nm (E 1% / 1 cm) 279 (72.9)

O : 34.46%

(iv) 分子量 : 11,900

(ポリエチレングリコールを標準とした
ゲル浸透クロマトグラフィーによる)。

(v) 赤外線吸収スペクトル

ν_{max} cm⁻¹ ; 3398, 2924, 1607,
1520, 1442, 1375,
1283, 1256, 1111,
1064, 799,

(vi) 紫外線吸収スペクトル

水 λ_{max} nm (E 1% / 1 cm) 279 (74.7)

0.1規定塩酸 λ_{max} nm (E 1% / 1 cm) 279 (78.3)

0.1規定水酸化ナトリウム λ_{max} nm (E 1% / 1 cm) なし

(vii) 溶解性：

水、メタノール、エタノールに可溶。ヘキサン、エーテル、酢酸エチル、クロロホルム不溶。

(iv) 呈色反応：

塩化第2鉄	(+)
ニンヒドリン	(-)
アニシジンージフェニルアミン	(-)
ドーラゲンドルフ	(-)
p-アニシジンーフタル酸	(-)

NPF-88BU-II-B

(i) 形 状：淡褐色粉末

(ii) 融 点：明瞭な融点、分解点を示さない。

(iii) 元素分析：

C : 54.24%

H : 4.50%

N : 0.21%

灰分 : 1.81%

(iv) 分子量：11,300

(ポリエチレングリコールを標準とした
ゲル浸透クロマトグラフィーによる)。

(v) 赤外線吸収スペクトル

 $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3376, 2926, 1607,
1519, 1442, 1366,

効成分とする制癌剤を提供するものである。

本発明は、脱脂したブドウの皮のメタノール抽出物を、透析チューブにより分画して得られる分子量1,000~10,000の画分からなるブドウの皮の親水性溶媒抽出物を効成分とする制癌剤を提供するものである。

本発明はさらに、脱脂したブドウの皮のメタノール抽出物を、透析チューブにより分画して得られる分子量10,000以上の画分からなるブドウの皮の親水性溶媒抽出物を効成分とする制癌剤を提供するものである。

以下、本発明について、更に詳細に説明する。

I. 原 料

本発明の制癌剤の原料としては、ブドウ科に属する各種の植物果皮を用いることができ、産地、品種を問わない。

市場において入手の容易なものとしては、例えばデラウェア、マスカット、巨峰、キャンベルアーリー等を挙げることができる。また赤ワインにも本発明の有効物質が含まれているので、

1283, 1251, 1209,

1109, 1062, 820,

(vi) 紫外線吸収スペクトル

水	λ_{max}	nm	(E 1%)	280 (98.8)
		1 cm		

0.1規定塩酸	λ_{max}	nm	(E 1%)	280 (100.4)
		1 cm		

0.1規定水酸化ナトリウム	λ_{max}	nm	(E 1%)	なし
		1 cm		

(vii) 溶解性：

水、メタノール、エタノールに可溶。ヘキサン、エーテル、酢酸エチル、クロロホルム不溶。

(viii) 呈色反応：

塩化第2鉄	(+)
ニンヒドリン	(-)
アニシジンージフェニルアミン	(-)
ドーラゲンドルフ	(-)
p-アニシジンーフタル酸	(-)

本発明は、ぶどうの皮の親水性溶媒抽出物を有

原料として用いることができる。

産業的な観点からは、ぶどう酒の製造工程において、主醸酵の前又は後に分離され、廃棄されるぶどうの果皮を用いることが有利である。

II. 抽 出

a) NPF-88BU-I 及びNPF-88BU-II

本発明の制癌剤の有効成分であるNPF-88BU-I 及びNPF-88BU-II はフェノール性物質であり、5'-ヌクレオチダーゼ阻害活性及び制癌活性によって特徴づけられるので、水、メタノール、エタノール等の親水性溶媒による抽出、遠心分離や透過などによって、これらの活性を指標として適当な精製手段を適用して単離・精製することができる。

これらの方針は、必要に応じて単独あるいは任意の順序に組合せ、または反復して適用できる。以下にNPF-88BU-I 及びNPF-88BU-II の抽出方法の1例を説明する。

i) ヘキサン、エーテルなどの脱脂溶媒を用いて、室温で、または加热して原料の脱脂溶媒

可溶部分を抽出除去する。

ii) 次いで脱脂した原料を、風乾又は真空乾燥して、溶媒を除去する。

iii) 次いでメタノールを脱脂した原料に加えて常法に従い抽出処理する。通常は沸騰下で抽出するが、室温又は4°C程度の低温室にて抽出を行なっても、活性成分が得られる。

iv) 得られたメタノール抽出液を濃縮乾固した後、水で抽出する。具体的には水を加えて懸濁液とし、不溶物を遠別し、さらに不溶物に水を加えて、よく攪拌した後通過し、前の液とあわせる。

v) 次に滤液を分画分子量1,000の透析チューブ（スペクトラ／ポア6；スペクトラムメディカルインダストリー社製）に入れ、水にて透析し、内液と外液に分画する。

vi) 分画分子量1,000の透析チューブにて分画した透析内液をさらに、分画分子量10,000の透析チューブ（スペクトラ／ポア6；スペクトラムメディカルインダストリ

る。

(第13図参照)

これら4種の物質の分離精製は、種々の公知の方法によって行なうことができるが、以下の条件で高速液体クロマトグラフを用いて行なうことが好ましい。

(i) 分離カラム

この際分離カラムとしては、分配・吸着型樹脂、イオン交換樹脂、ゲル通過型の分離剤等を充填したものを用いることができる。また付属的に自動注入や自動分取を行う装置を使用することも好ましい。

(ii) 溶離剤

溶離剤としては、水-メタノール系の他、水、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、酢酸、ブタノール、ヘキサンその他の各種緩衝溶液を単独で、又は任意の比率で混合して、用いることができる。

(iii) 指標

本発明の有効物質を検出するための指標と

一社製）に入れ、水にて透析し、内液と外液に分画する。

v) このように分画した分子量1,000～10,000及び10,000以上の画分は強い制癌活性を示す。これらの画分はさらに凍結乾燥などの操作により、それぞれ淡褐色の粉末として得ることができる。

本発明者は、分子量1,000～10,000及び10,000以上に分画された有効物質を各々NPF-88BU-I及びNPF-88BU-IIと命名した。

b) NPF-88BU-I A、NPF-88BU-I B、NPF-88BU-II A及びNPF-88BU-II B

このように、透析チューブにて分画してきたNPF-88BU-I及びNPF-88BU-IIは、さらにそれ2つの画分に分離できる。

すなわちNPF-BU-Iは、分子量7,850の画分(NPF-88BU-IA)と分子量5,950の画分(NPF-88BU-IB)より、またNPF-88BU-IIは分子量11,900の画分(NPF-88BU-IIA)と分子量11,300の画分(NPF-88BU-IIB)より構成されてい

しては、280nmの波長の吸光度及び5'-ヌクレオチダーゼ阻害活性を用いることができる。

(iv) 処理方式

処理方式としては、オープンカラム、中圧又は高圧方式を用いることができる。

NPF-88BU-I A、NPF-88BU-I B、NPF-88BU-II A及びNPF-88BU-II Bは、前記高速液体クロマトグラフでそれぞれ単一のピークを示し、5'-ヌクレオチダーゼ阻害活性が一致する。

また、本物質の分子量を測定するために行なったゲル浸透クロマトグラフにても单一ピークを示す。

各種ポリエチレングリコールの標準分子量にて検討したところNPF-88BU-I Aの分子量は7,850、NPF-88BU-I Bは、5,950、NPF-88BU-II Aは11,900そしてNPF-88BU-II Bは11,300と決定された。

以上述べてきたようにNPF-88BU-Iは、NPF-88

BU-I AとNPF-88BU-II Bの混合物で、一方NPF-88BU-IIはNPF-88BU-II AとNPF-88BU-II Bの混合物である。

後で述べるが、制癌活性に関しては、NPF-88BU-I A、NPF-88BU-II B、NPF-88BU-II A、NPF-88BU-II BさらにNPF-88BU-I、NPF-88BU-IIはほぼ同程度の効果が認められる。

尚、有効物質は、メタノール、エタノール、水に可溶であるため、前述の抽出方法は、原料のメタノール抽出物より出発しているが、高価な有機溶媒を節約するためにはまず大量の水または熱湯にて抽出した後、同様の操作を行ってもよい。

また前記の紫外線吸収スペクトルでもあきらかのように、アルカリ性にすると、本発明の新規物質はいずれも黄褐色から赤褐色に着色するので、抽出過程全体を硫酸や有機酸を用いて弱酸性下で行うことも有効な抽出手段である。

メタノール等の親水性溶媒による粗抽出物も制癌活性を有し、本発明の制癌剤の有効成分として使用できるが、不純物をできる限り除去し、より

ヒ細胞、HL-60細胞について同様に検討したところ、NPF-88BU-I 及びNPF-88BU-II と同程度の効果が得られた。

IV. 毒性及び変異原性

急性毒性

マウス腹腔内投与により求める。

NPF-88BU-I	LD ₅₀ > 400 mg/kg
NPF-88BU-II	LD ₅₀ = 300 mg/kg
NPF-88BU-II A	LD ₅₀ > 400 mg/kg
NPF-88BU-II B	LD ₅₀ > 400 mg/kg
NPF-88BU-II A	LD ₅₀ = 300 mg/kg
NPF-88BU-II B	LD ₅₀ = 300 mg/kg

変異原性

サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium TA 100*、*S. typhimurium TA 98*) を用い、復帰変異を指標とした変異原性試験を実施したところ、NPF-88BU-I 及びNPF-88BU-II は、変異原性を有しなかった。

また上述の直接試験に、さらには乳動物のもつ、薬物代謝酵素 (S-9) を検体に作用させて產生

制癌作用の強い物質を得、これを使用することが好ましい。

III. 制癌活性の検定

a) 生体内試験

1群10匹のICR雄マウスに 1×10^5 個のエーリッヒ (Ehrlich) 腹水細胞を腹腔内移植し、24時間後より各濃度の有効成分を注射剤として腹腔内へ、1日1回 10日間連続投与したところ、第14図及び第15図に示す如く、優れた制癌作用を示した。

b) 生体外試験

エーリッヒヒレトアサイテスカルシノーマ E株 (Ehrlich-Lettre Ascites Carcinoma Strain E) 細胞またはHL-60細胞を直径5cmのシャーレに播き、37℃にて24時間培養した後、各濃度の有効成分を添加し、再び培養して経時的に細胞数を測定した。

結果を第16図及び第17図に示す。

また、NPF-88BU-I A、NPF-88BU-II B、NPF-88BU-II A及びNPF-88BU-II Bについてエーリッ

される代謝物の変異原性を検討したが、変異原性を有しなかった。

以上的方法は、一般にエイムス (Ames) テストと呼ばれている。(D.M. Maron and B.N. Ames: Mutation Research, 113, 173 (1983))。

V. 投与方法

本発明の制癌剤は、経口及び非経口投与のいずれも使用可能であり、経口投与する場合は、軟・硬カプセル剤又は錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤として投与され、非経口投与する場合は、注射剤、点滴剤及び固体状又は懸濁粘稠液状として持続的な粘膜吸収が維持できるように坐薬のような剤型で投与され得るが、癌の原発部位、手術後の癌摘出部位等の局所組織内投与、皮内、皮下、筋肉内、静脈内注射、局所への塗布、噴霧、坐剤、膀胱内注射などの外用的投与法等も用いることができる。

VI. 投与量

投与量は、投与法と癌の悪性度、患者の年令、病状や一般状態、癌の進行度等によって一定し

たものではないが、大人では通常、1日当り有効成分として0.5~5,000mg、小人では通常、0.5~3,000mgである。

VII. 製剤化の方法

本発明の制癌剤の有効成分の割合は、剤型によって変更し得るが、通常、経口又は粘膜吸収に投与されるとき、ほぼ0.3~15.0重量%が適当であり、非経口投与されるときは、ほぼ0.01~1.0重量%が適当である。

また、本発明の有効成分を製剤化するに当っては、常法に従い、水溶液、油性製剤などにして皮下或いは静脈注射用製剤とすることができる他、カプセル剤、錠剤、細粒剤等の剤型に製剤化して経口用に供することができる。

また、有効成分に長時間の保存に耐える安定性及び耐酸性を付与して薬効を完全に持続させるために、更に医薬的に許容し得る皮膜を施して製剤化すれば、すぐれた安定性を有する制癌剤組成物とすることができます。

本発明の有効成分の製剤化に用いられる界面

活性剤、賦形剤、滑沢剤、佐剤及び医薬的に許容し得る皮膜形成物質等を挙げれば、次のとおりである。

本発明の組成物の崩壊、溶出を良好ならしめるために、界面活性剤、例えばアルコール、エステル類、ポリエチレングリコール誘導体、ソルビダンの脂肪酸エステル類、硫酸化脂肪アルコール類等の1種又は2種以上を添加することができる。

また、賦形剤として、例えば蔗糖、乳糖、デンプン、結晶セルロース、マンニット、軽質無水珪酸、アルミン酸マグネシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウム、合成珪酸アルミニウム、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸水素カルシウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム等の1種又は2種以上を組合せて添加することができる。

滑沢剤としては、例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、硬化油等を1種又は2種以上添加することができ、また防腐剤及び臭味剤と

して、食塩、サッカリン、糖、マンニット、オレンジ油、カンゾウエキス、クエン酸、ブドウ糖、メントール、ユーカリ油、リンゴ酸等の甘味剤、香料、着色剤、保存料等を含有させてもよい。

懸濁剤、混淵剤の如き佐剤としては、例えばココナツ油、オリーブ油、ゴマ油、落花生油、乳酸カルシウム、ベニバナ油、大豆リン脂質等を含有させることができる。

また皮膜形成物質としては、セルロース・糖類等の炭水化物誘導体として酢酸フタル酸セルロース(CAP)、またアクリル酸系共重合体、二塩基酸モノエ斯特類等のポリビニル誘導体としてアクリル酸メチル・メタアクリル酸共重合体、メタアクリル酸メチル・メタアクリル酸共重合体等が挙げられる。

また、上記皮膜形成物質をコーティングするに際し、通常使用されるコーティング助剤、例えば可塑剤の他、コーティング操作時の薬剤相互の付着防止のための各種添加剤を添加すること

によって皮膜形成剤の性質を改良したり、コーティング操作をより容易ならしめることができる。

〔発明の効果〕

本発明の制癌剤は、毒性が極めて低く、重大な副作用を呈することなく、優れた制癌活性を有する。

〔実施例〕

以下、実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。

実施例1：有効物質の製造

協和発酵工業株式会社より分与されたワイン原料ブドウの皮(品種ヴェルデレー)を原料として、次の工程により本発明の有効物質を製造した。

- ① ウェット状態ブドウの皮1kgをメタノール3,000ml中に浸漬し、沸騰下3時間抽出した。この操作を3回行ない、抽出液を集めた。
- ② 得られた抽出液を集め、エバポレーターにて水浴40℃で減圧下濃縮し、真空下乾燥した。これに水650mlを加え、攪拌後滤過した。

不溶物はさらに水200mlを加えて搅拌後滤過し、滤液を集めた。

ハ) ここで得られた滤液を分画分子量1,000の透析チューブ（スペクトラ／ポア6；スペクトラムメディカルインダストリー社製）に入れ、水にて4℃で1週間搅拌しながら、その間に外液を毎日交換して、透析し、内液と外液に分画した。

ニ) 分画分子量1,000の透析チューブにて分画した透析内液をさらに分画分子量10,000の透析チューブ（スペクトラ／ポア6；スペクトラムメディカルインダストリー社製）に入れ、水にて4℃で1週間搅拌しながら、その間に外液を毎日交換して、透析し、内液と外液に分画した。

ホ) このように分画したところ、分子量1,000～10,000および10,000以上の分画部分に目的とする制癌活性及び5'-ヌクレオチダーゼ阻害活性を認め、凍結乾燥により、有効物質を2種とも淡褐色の粉末として得ることがで

きた。

分子量1,000～10,000の画分(NPF-88BU-I)は2.59g得ることができ、分子量10,000以上の画分(NPF-88BU-II)は1.05g得ることができた。

分子量1,000以下の画分は13.07g得ることができたが、5'-ヌクレオチダーゼ阻害活性はNPF-88BU-I及びNPF-88BU-IIに比べて非常に弱かった。

得られた各画分について5'-ヌクレオチダーゼ阻害活性を以下のようにして検定した。

基質溶液としては、5.5mMの塩化マグネシウムを含む5.5mMのトリス塩酸緩衝液(pH 8.5)に1.1mMのアデノシンモノホスフェートナトリウム塩〔シグマ(Sigma)社製、Type II〕と1.0mMの酒石酸ナトリウムカリウム塩を溶解したもの用いた。

また酵素液としてはヘビ毒由来5'-ヌクレオチダーゼ〔シグマ(Sigma)社製〕を使用した。

検定は次のように行った。

基質溶液0.45mlと酵素液10μl及び検定試料を40μl加え温浴中30℃で、20分間反応させ、反応終了後、0.5mlの10%トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させ、生成する沈殿物を遠心分離した。この上清0.5mlをとり、1%トリトンX-25μl、蒸留水1.8ml及び2.5%(W/V)モリブデン酸アンモニウムを含む5規定の硫酸水溶液0.25mlを加え、20分後660nmの吸光度を用いて測定した。

結果を表1に示す。

表 1

段階	収量(g)	5.0%阻害濃度 IC ₅₀ (μg/ml)
メタノール抽出物 で水可溶部	23.69	7.64
分画分子量1,000 以下	13.07	—
分画分子量 1,000～10,000 (NPF-88BU-I)	2.59	1.72
分画分子量 10,000以上 (NPF-88BU-II)	1.05	1.04

またNPF-88BU-I及びIIの生体内における制癌活性試験の結果を各々第14図及び第15図に、また生体外試験の結果を第16図及び第17図に示す。

実施例2：有効物質の製造

市販の巨峰(山梨一宮農業協同組合より貢入)を原料として用いた。

イ) 巨峰を果肉と果皮に分離し、ウェット状態の皮213.3gをメタノール1,000mlに浸漬し、沸騰下3時間抽出した。この操作を3回行ない、抽出液を得た。

ロ) 以降は実施例1と同様に実施した。

結果を表2に示す。

表 2

段 階	收 量 (g)	5 0 % 阻害濃度 IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
メタノール抽出物 で水可溶部	21.98	59.0
分画分子量1,000 以下	17.14	—
分画分子量 1,000~10,000 (NPF-88BU-I)	0.44	6.38
分画分子量 10,000以上 (NPF-88BU-II)	0.29	2.48

実施例3：有効物質の製造

市販の巨峰（実施例2と同一物）を原料として用いた。

A) 水抽出

巨峰の皮100gを水300mlに浸漬し、95℃で5分間加熱後、4℃にて2日間攪拌し抽出した。これを遠心分離し、上清を得、凍結乾燥することにより粉末（11.8g）を得た。5'-ヌクレオチダーゼに対する50%阻害濃度は60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

4.8mg、NPF-88BU-II B 7.5mg得た。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、NPF-88BU-Iの赤外線吸収スペクトルを示す。

第2図は、NPF-88BU-Iの紫外線吸収スペクトル（水中）を示す。

第3図は、NPF-88BU-Iの紫外線吸収スペクトル（0.1規定塩酸溶液中）を示す。

第4図は、NPF-88BU-Iの紫外線吸収スペクトル（0.1規定水酸化ナトリウム溶液中）を示す。

第5図は、NPF-88BU-IIの赤外線吸収スペクトルを示す。

第6図は、NPF-88BU-IIの紫外線吸収スペクトル（水中）を示す。

第7図は、NPF-88BU-IIの紫外線吸収スペクトル（0.1規定塩酸溶液中）を示す。

第8図は、NPF-88BU-IIの紫外線吸収スペクトル（0.1規定水酸化ナトリウム溶液中）を示す。

第9図は、NPF-88BU-I Aの赤外線吸収スペクトルを示す。

B) メタノール抽出

巨峰の皮100gをメタノール500mlに浸漬し、室温下2日間攪拌し抽出する。口過後、エバボレーターにて濃縮乾固し、12.2gの抽出物を得た。5'-ヌクレオチダーゼに対する50%阻害濃度は60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

実施例4

NPF-88BU-I及びNPF-88BU-IIよりNPF-88BU-I A、NPF-88BU-I B、NPF-88BU-II A及びNPF-88BU-II Bの分離・精製を高速液体クロマトグラフにて行なった。条件は次のとおりである。

分離カラム： 吸着・分配型樹脂をつめたもの
(Shodex RS-pack、DB-613：
昭和電工社製)

溶離液： 水：メタノール=1:9
検出器： 紫外分光検出器（日本分光工業
製）280nm
NPF-88BU-I、18.5mgよりNPF-88BU-I A
1.7mg、NPF-88BU-I B 7.7mgを得た。
またNPF-88BU-II、20.0mgよりNPF-88BU-II A

第10図は、NPF-88BU-I Bの赤外線吸収スペクトルを示す。

第11図は、NPF-88BU-II Aの赤外線吸収スペクトルを示す。

第12図は、NPF-88BU-II Bの赤外線吸収スペクトルを示す。

第13図は、NPF-88BU-I及びNPF-88BU-IIの高速液体クロマトグラムを示す。

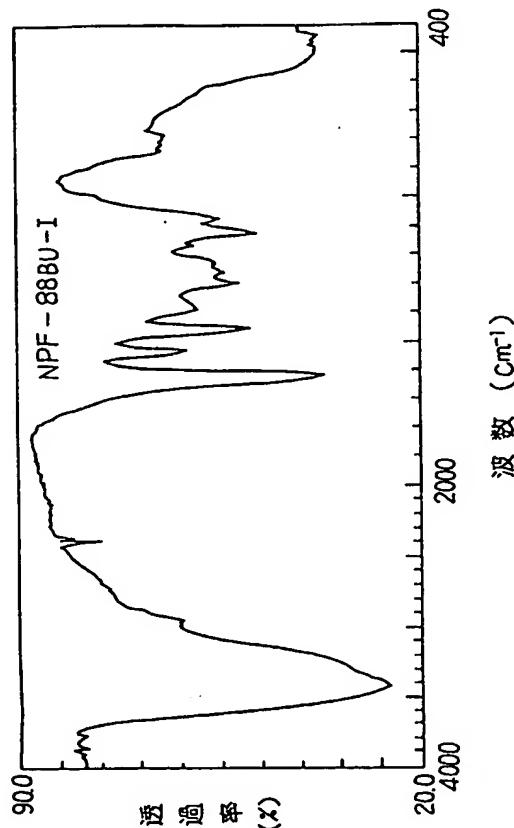
第14図は、ICR雄マウスにエーリッヒ細胞を移植した後、本発明の制癌剤（NPF-88BU-I）を投与した場合及び投与しない場合の各日数経過時の生存率を表すグラフである。

第15図は、ICR雄マウスにエーリッヒ細胞を移植した後、本発明の制癌剤（NPF-88BU-II）を投与した場合及び投与しない場合の各日数経過時の生存率を表すグラフである。

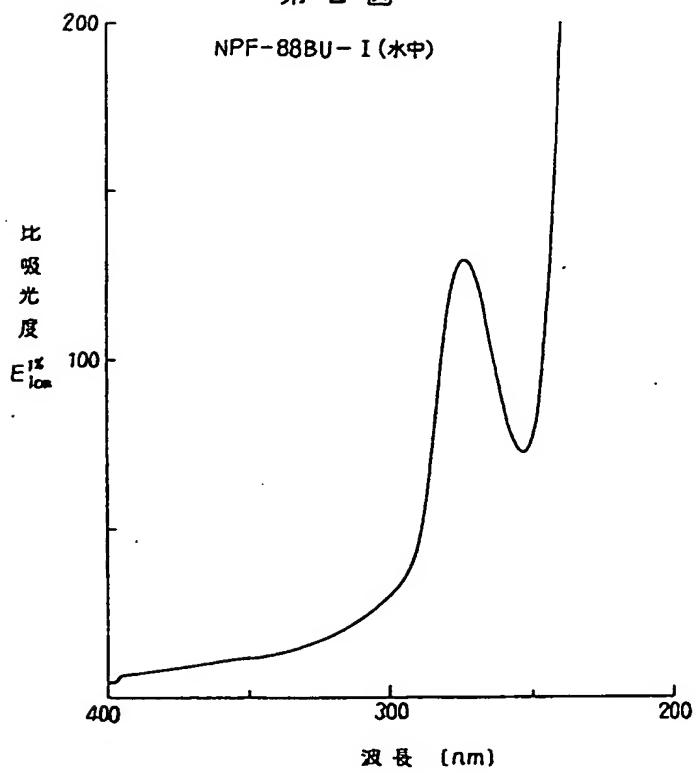
第16図は、シャーレ中のエーリッヒ細胞に対して、NPF-88BU-Iを添加した場合、NPF-88BU-IIを添加した場合及び何も添加しなかった場合の、各日数経過時における生存細胞数を表す。

第17図は、シャーレ中のHela細胞に対して、NPF-88BU-Iを添加した場合、NPF-88BU-IIを添加した場合及び何も添加しなかった場合の、各日数経過時における生存細胞数を表す。

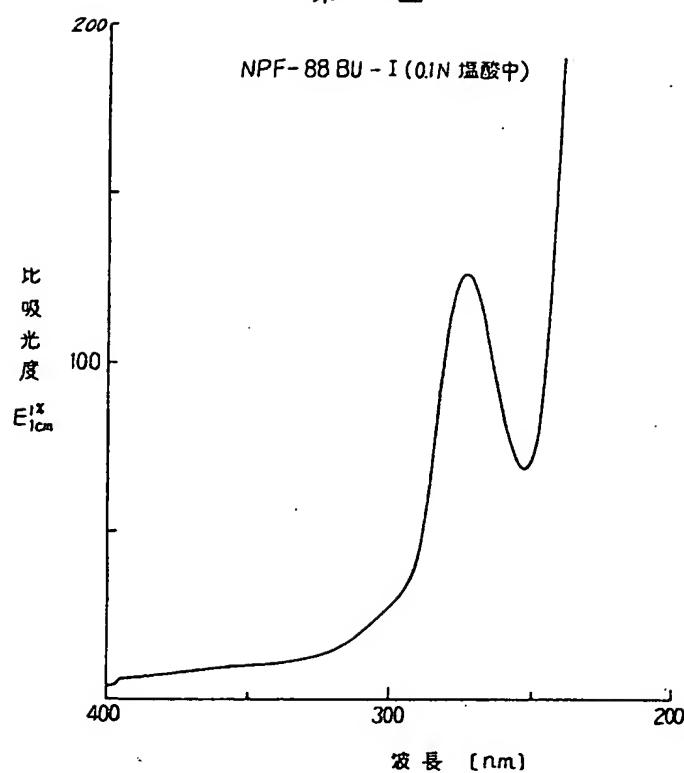
第1図



第2図

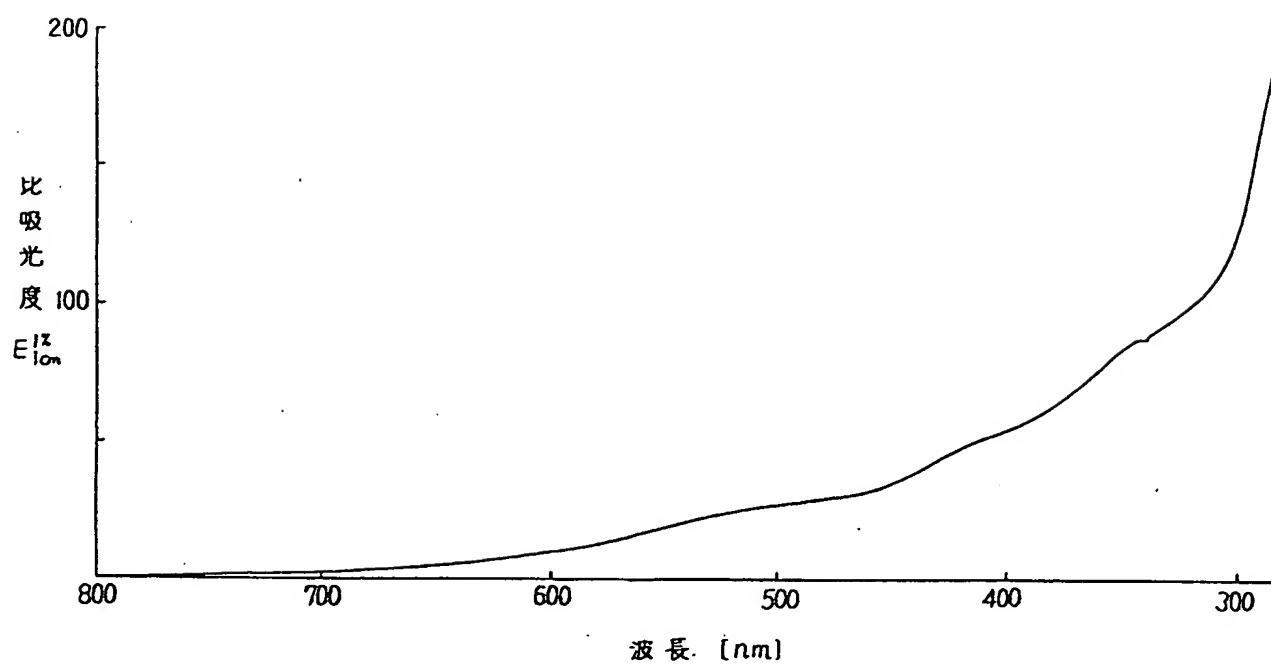


第3図

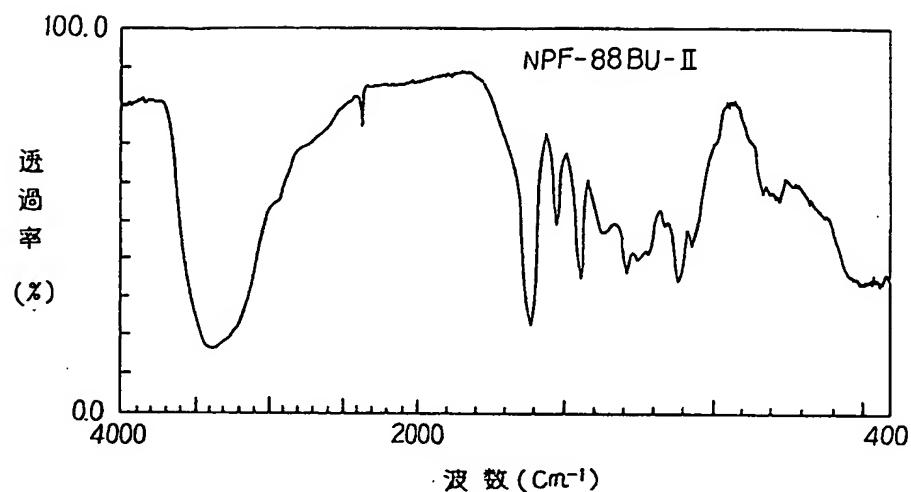


第4図

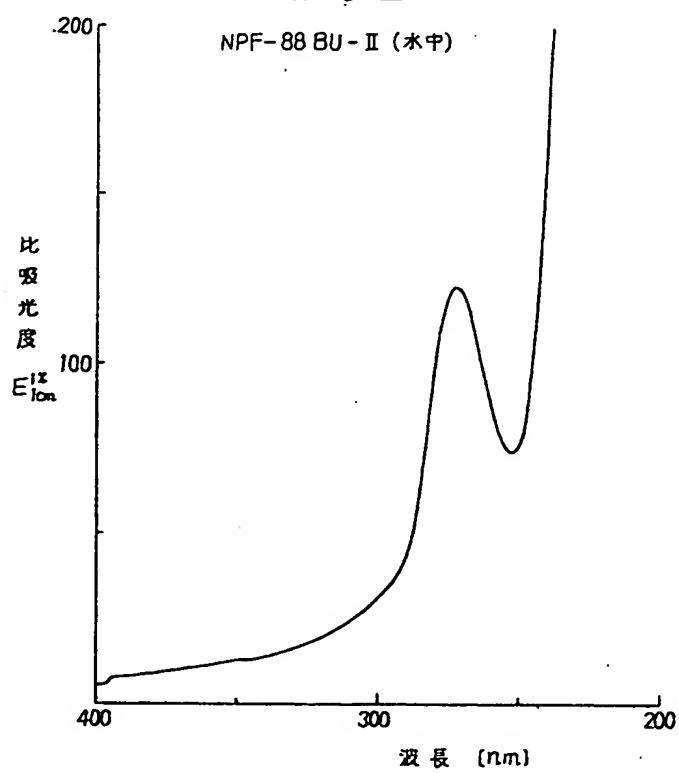
NPF-88BU-I (0.1N 水酸化ナトリウム中)



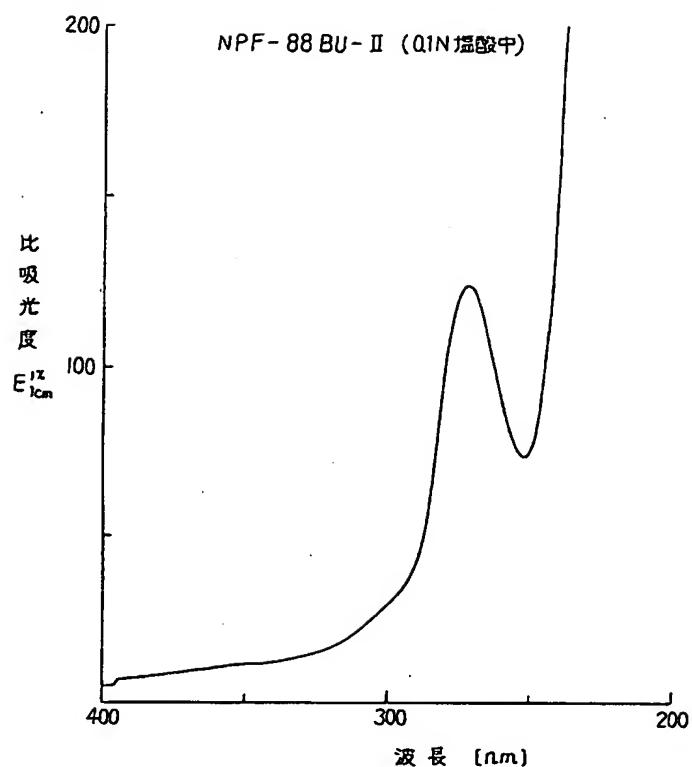
第5図



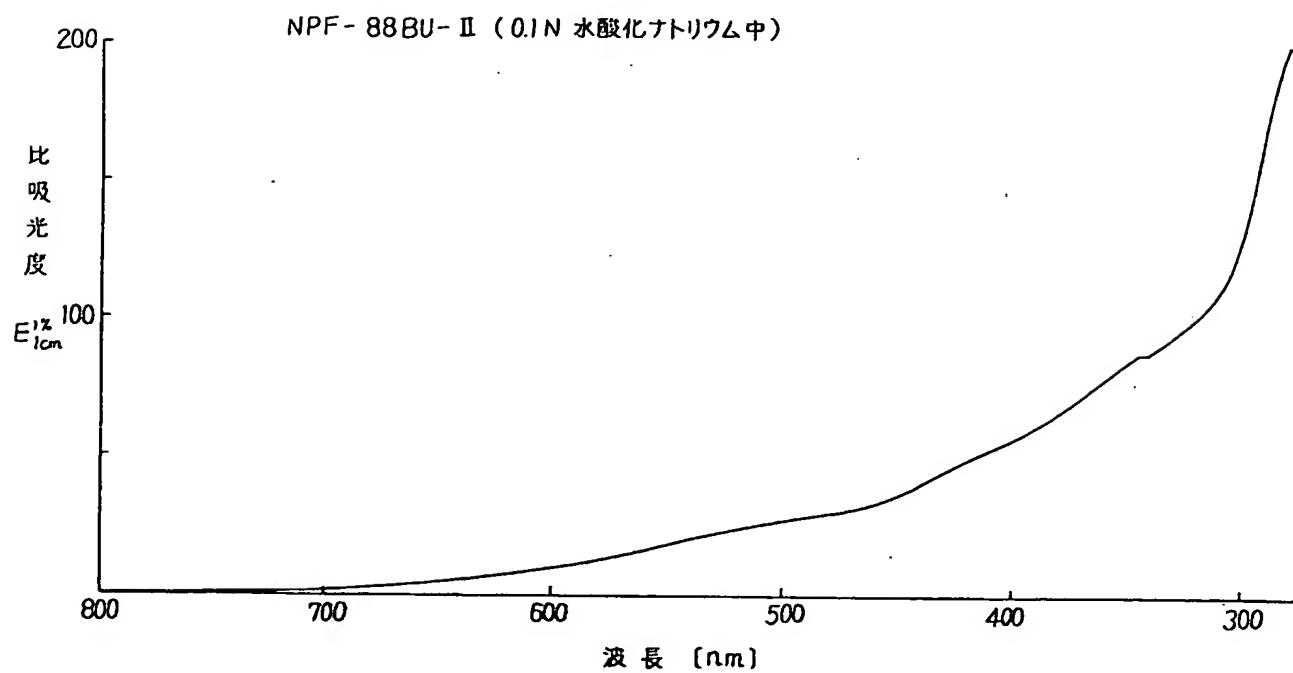
第6図



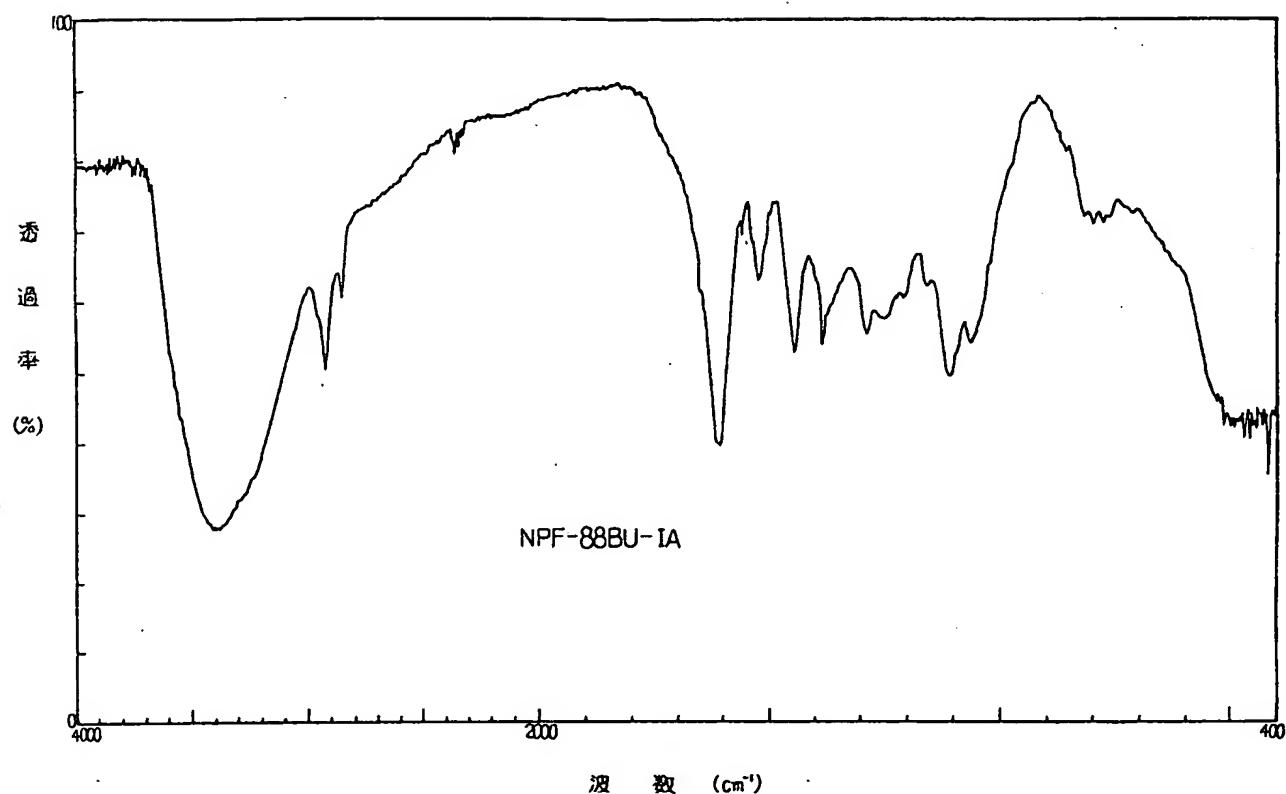
第 7 図



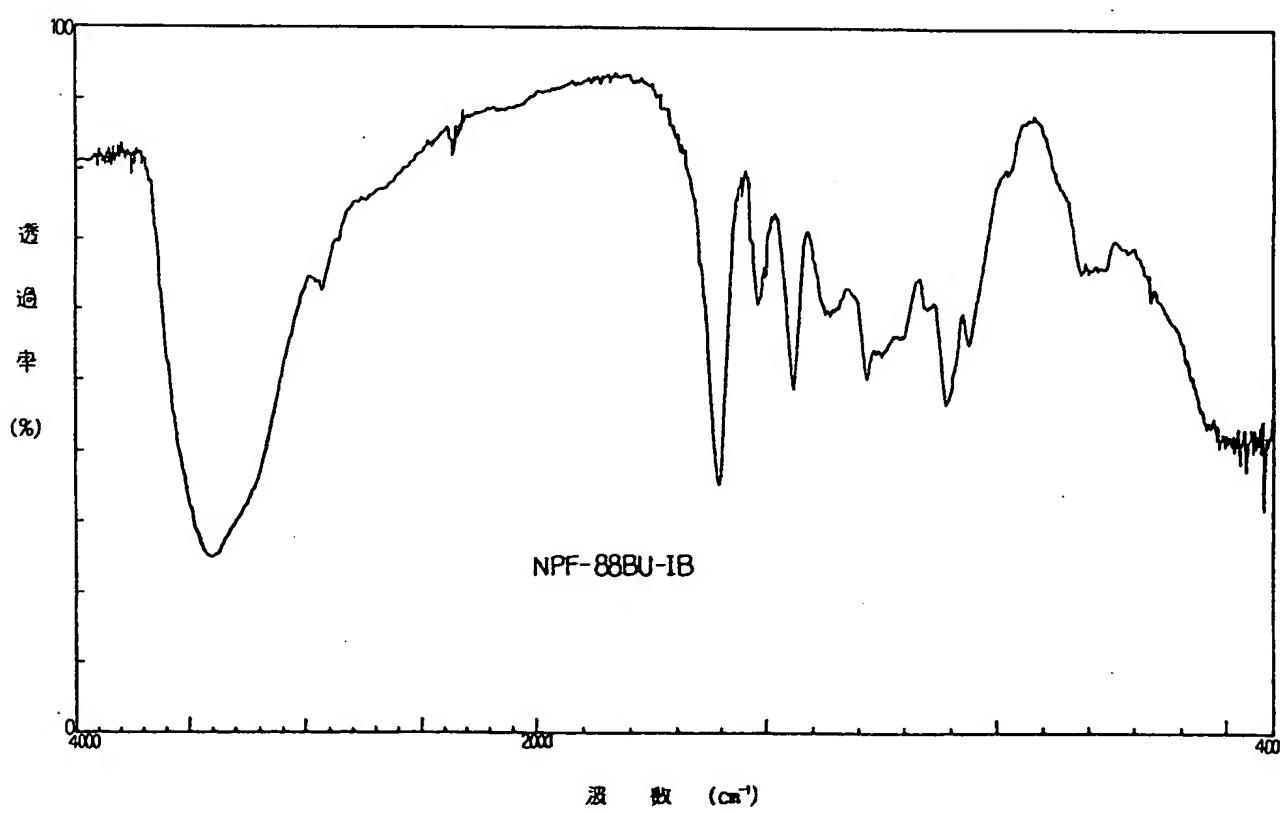
第 8 図



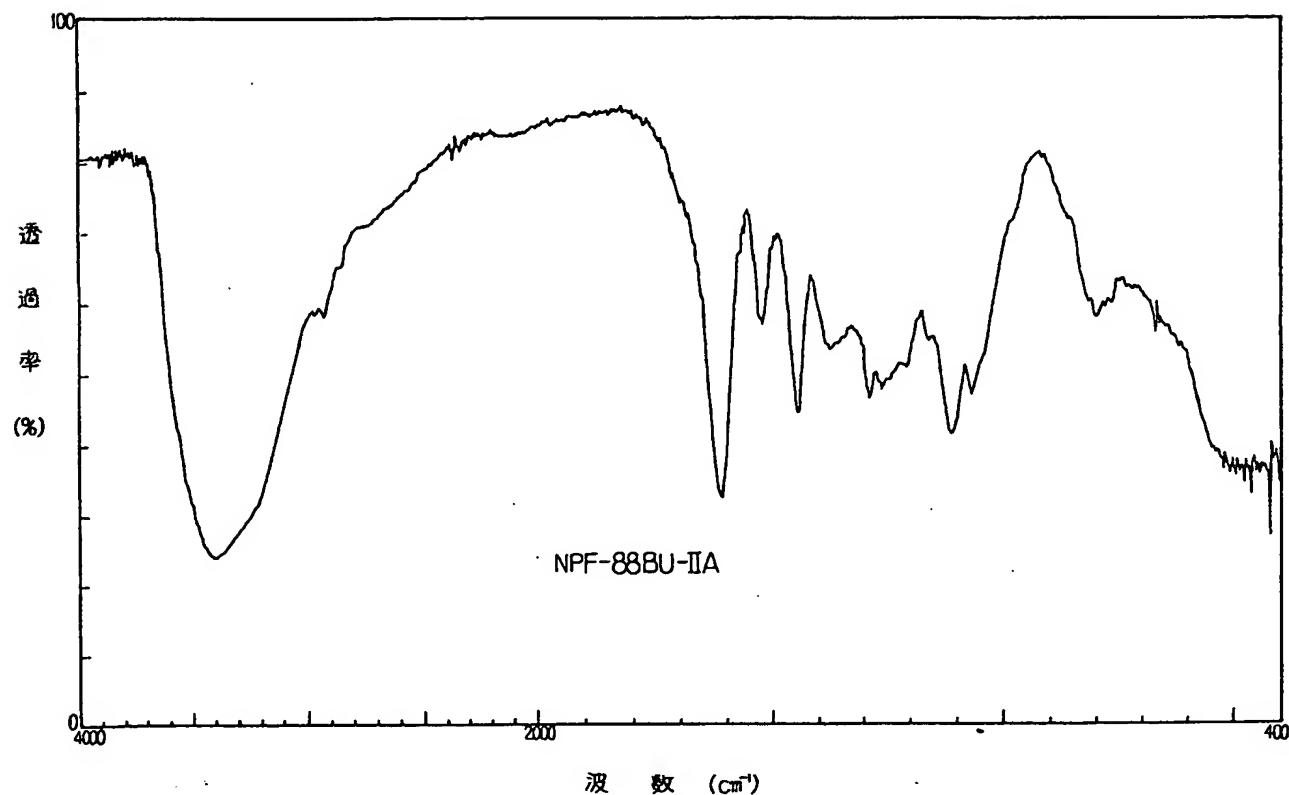
第9図



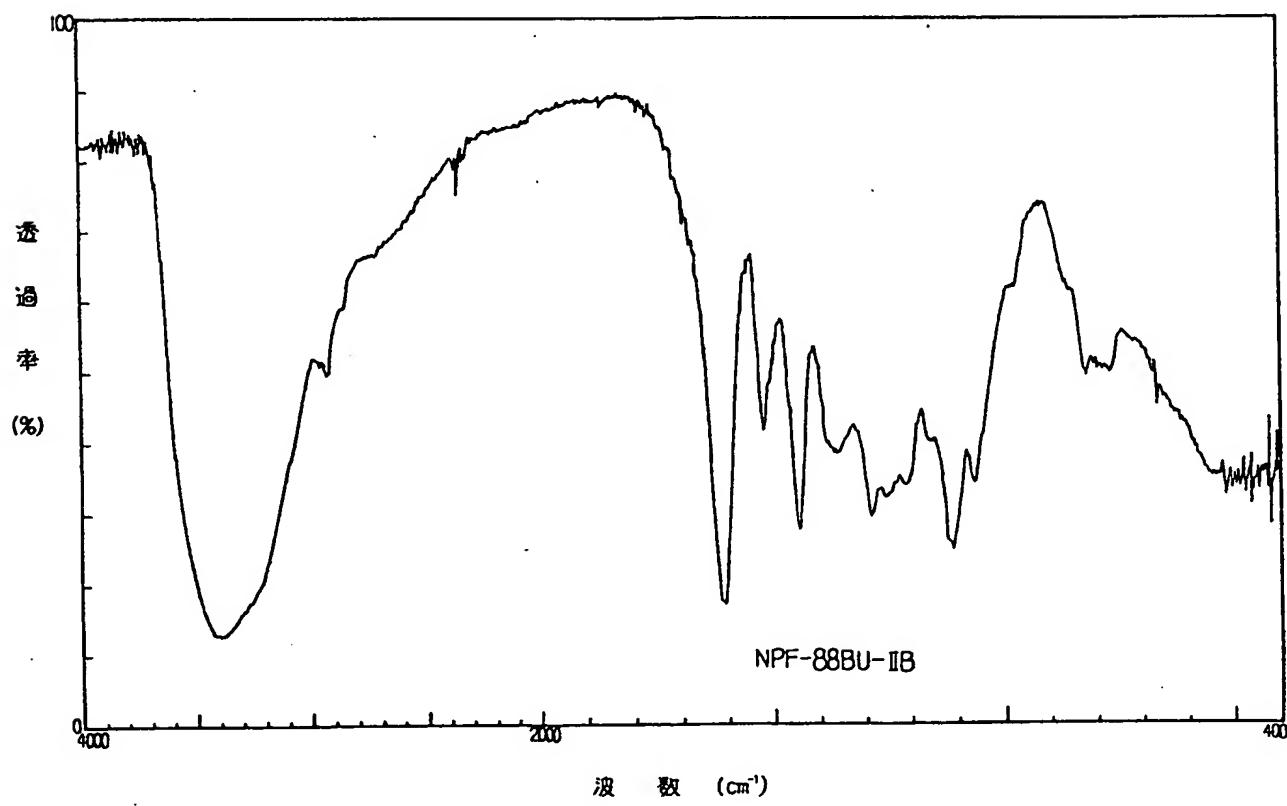
第10図



第11図

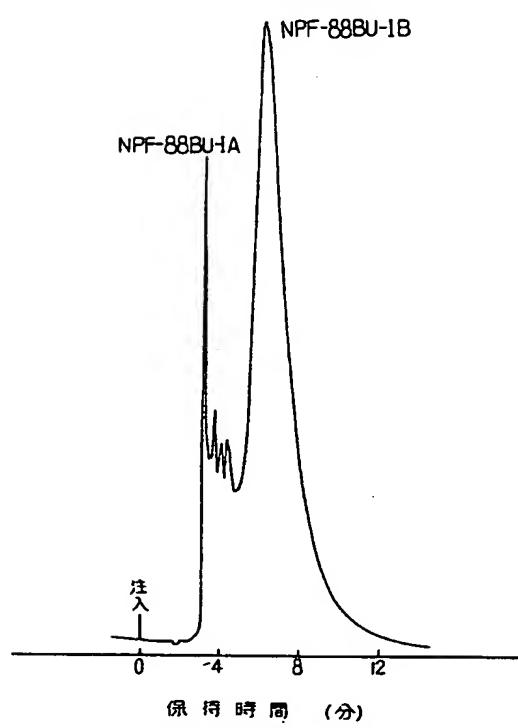


第12図



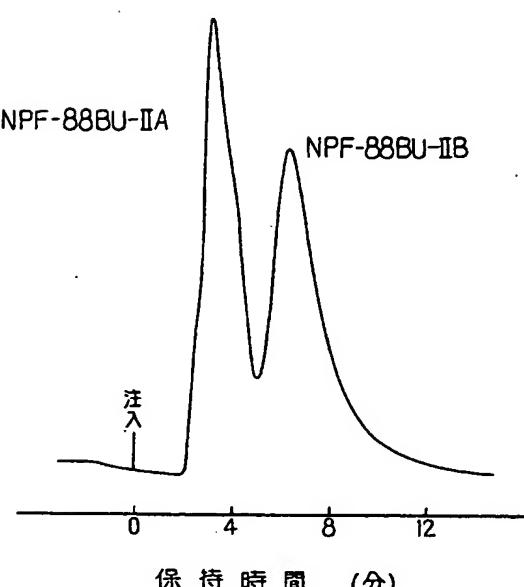
第13図

(a) NPF-88BU-I



第13図

(b) NPF-88BU-II

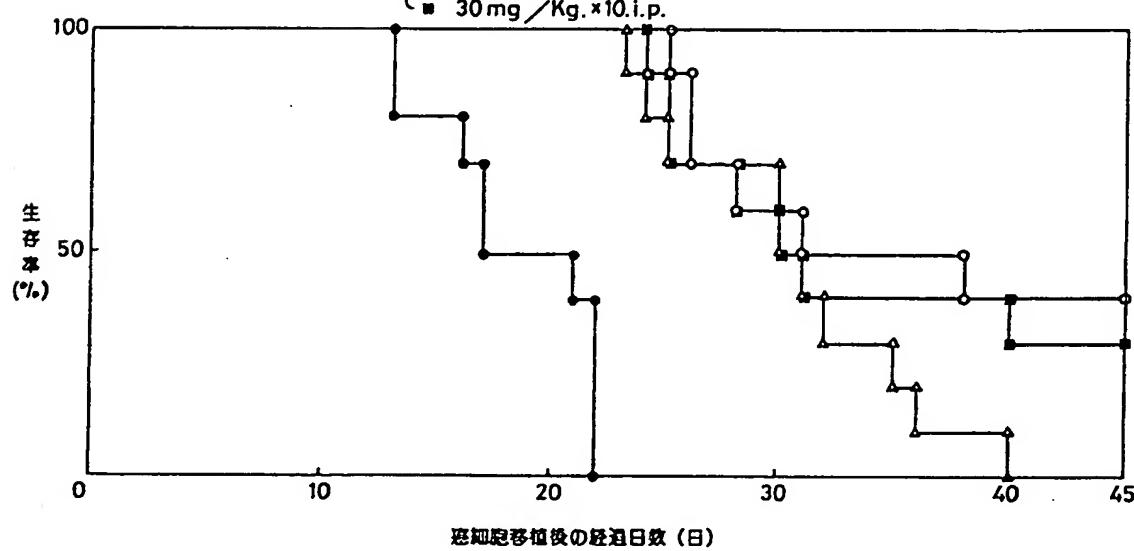


第14図

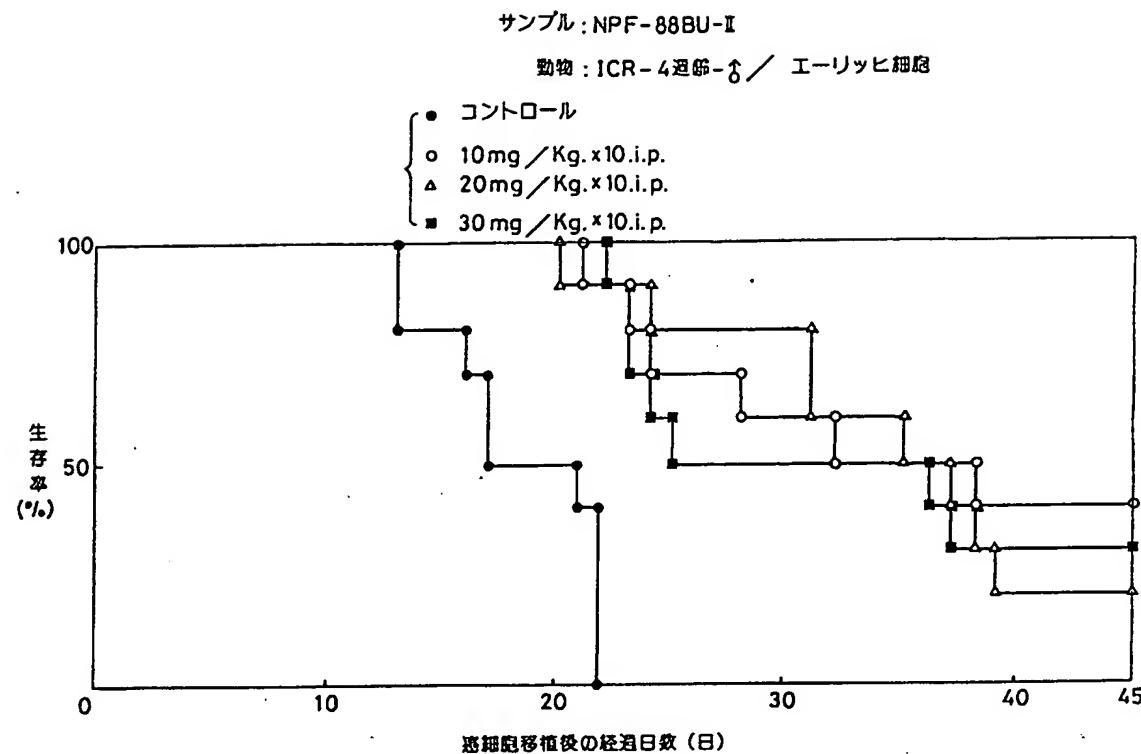
サンプル : NPF-88BU-I

動物 : ICR-4週齢-♂ / エーリッヒ細胞

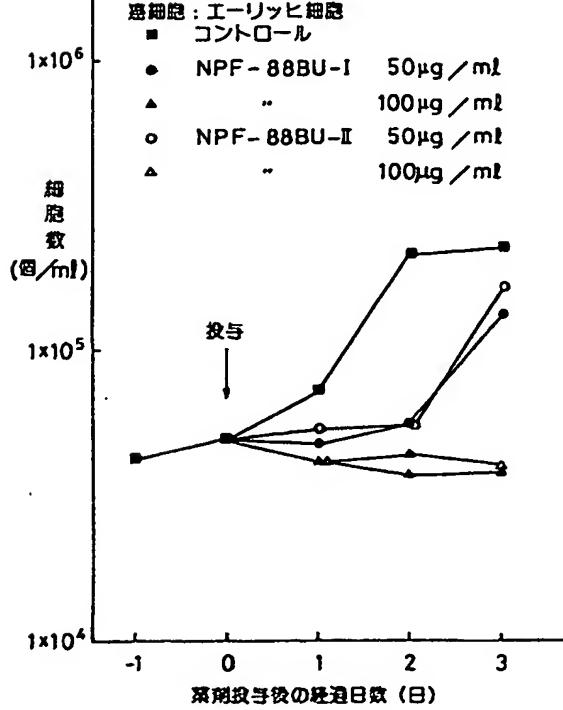
- コントロール
- 10 mg/Kg. × 10 i.p.
- △ 20 mg/Kg. × 10 i.p.
- 30 mg/Kg. × 10 i.p.



第15図



第16図



第17図

